

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

と畜・食鳥処理場における HACCP 検証方法の確立と

食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究

研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

### 分担研究報告書

と畜場由来病原細菌の性状解析

研究分担者 大屋 賢司 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

国産食肉・食鳥肉の輸出が拡大され輸出を行うと畜場・食鳥処理場数が増加傾向にある中、我が国の食肉・食鳥肉の安全性を国際標準的に示すことは極めて重要である。本研究は、国内全てのと畜場・食鳥処理場において実効可能な HACCP 外部検証法を、科学的根拠を伴った形で提示することを目的とする。今年度は、牛の外部検証プロトコールの実効性評価の基礎的情報とするために、特定のと畜場に搬入される牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原微生物検出状況の関連性を検討した。衛生指標菌の測定は通知（生食発 0528 第 1 号）「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」、サルモネラ属菌の分離培養は ISO6579-1、腸管出血性大腸菌（STEC）のスクリーニング及び分離培養は ISO/TS13136 にそれぞれ従って行った。サルモネラ属菌はいずれの検体からも分離されなかったものの、特定の農場から搬入される検体が STEC 0157 に高度に汚染されている状況が明らかとなった。STEC 分離陽性の検体及び STEC 分離陽性検体が飼育されていた農場では、衛生指標菌数が STEC 分離陰性の場合に比べて多い傾向にあった。しかし、検体毎の衛生指標菌数のばらつきが大きく、より実効性の高い外部検証法を設定するためには、経時的な採材を行い、と畜場毎の傾向を分析すること等が重要であることが考えられた。

## A. 研究目的

国産食肉・食鳥肉の輸出が拡大され輸出を行うと畜場・食鳥処理場数が増加傾向にある中、我が国の食肉・食鳥肉の安全性を国際標準的に示すことは極めて重要である。本研究では、国内全てのと畜場・食鳥処理場において実効可能な HACCP 外部検証法を、科学的根拠を伴った形で提示することを目的とする。今年度は、牛の外部検証プロトコールの実効性評価の基礎的情報とするために、特定のと畜場に搬入される牛と体における衛生指標菌数と病原微生物検出状況の関連性を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 検体

東海地方の食肉衛生検査所に搬入された牛と体外皮拭き取り検体 12 検体を対象とした。採材後の検体は冷蔵便にて搬入され、通知（生食発 0528 第 1 号）「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」に従い、採材後 48 時間以内に試験に供した。

### (2) 検体の検査

#### 1) 衛生指標菌の検査

滅菌 PBS を用いて、送付された検体の 10 倍階段希釈系列を作製

し、通知（生食発 0528 第 1 号）

「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」に従い、検体中の生菌数及び腸内細菌科菌群数を混釈法にて計測した。フロー図を図 1 に示す。一般生菌数は、検体希釈液を混釈した標準寒天培地を 37℃、48±3 時間培養し、生育したコロニー数を計測し算出した。腸内細菌科菌群数は、検体希釈液を混釈した Violet Red Bile Glucose 寒天培地（VRBG、OXOID）を 37℃、24±2 時間培養し、生育したコロニー数を計測した。オキシダーゼ試験及び糖発酵試験にて腸内細菌科菌群の確認試験を行い、腸内細菌科菌群数を算出した。

#### 2) サルモネラ属菌の検査

検体中のサルモネラ属菌は、IS06579-1 に従い分離培養を行った。フロー図を図 2 に示す。送付された検体を 9 倍量の緩衝ペプトン水（BPW）に加え、37℃、18±2 時間、前増菌培養を行った。さらに、Rappaport Vassiliadis 培地（RVS、Merck）及び Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin 培地（MKTTn、Merck）を用いて選択増菌培養を行った。RVS 培地に接種した検体は 42℃、

24±3 時間、MKTTn 培地に接種した検体は 37℃、24±3 時間培養した。選択分離培養として、選択増菌培養液を Xylose Lysine Deoxycholate 寒天培地 (XLD、関東化学) 及びクロモアガーサルモネラ寒天培地 (CHROMagar) に画線塗抹し 37℃、24±3 時間培養した。

### 3) 腸管出血性大腸菌の検査

検体中の腸管出血性大腸菌 (STEC) は、ISO/TS13136 に従いスクリーニング及び分離培養を行った。フロー図を図 3 に示す。送付された検体を 9 倍量のノボビオシン加 mTSB 培地に加え 37℃、18 から 24 時間増菌培養を行った。増菌培養液からアルカリ熱抽出法により DNA を調製し、*stx* 及び *eae* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR によるスクリーニングを行った。*stx* 及び *eae* どちらも陽性となった検体は、STEC 主要 7 血清群の 0 抗原遺伝子を標的としたリアルタイム PCR に供した。いずれかの血清群に陽性を示した検体は、陽性となった血清群の免疫磁気ビーズを用いて増菌培養液中の STEC を濃縮し、選択分離培養を行った。7 血清群の免疫磁気ビーズは、デンカ株式会社のものを用いた。選択分離培養

には Tryptone Bile X - glucuronide 寒天 (TBX、Merck) 及びクロモアガー STEC 寒天培地 (CHROMagar) を用い、免疫磁気ビーズ濃縮液を塗抹し 37℃、18 から 24 時間培養した。選択分離培地上に生育した STEC が疑われるコロニーは、*stx* を標的としたリアルタイム PCR、0 抗原に対する血清を用いた凝集試験及び Triple Sugar Iron (TSI、栄研化学) 培地、Lysine Indole Motility (LIM、日水製薬) 培地を用いた生化学性状試験により確認試験を行った。

### (3) 腸管出血性大腸菌の性状解析

STEC と同定された菌株は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社) の H 血清を用いた試験管凝集法により H 型を決定した。分離された STEC 菌株の関連性は、腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (2018 年 11 月編、地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編) に従い、反復配列多型解析法 (MLVA) を行い解析した。

### (4) 衛生指標菌数と STEC 分離状況の関連性の解析

検体を STEC の分離陽性及び陰性の 2 群に分類し、衛生指標菌数を比較した。2 群間の差の検定は、

Welch 法により行った。統計解析及び、蜂群図・箱ひげ図によるデータの可視化は統計解析システム・環境 R (version 4.0.4) を用いて行った。

## C. 研究結果

### (1) 牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌検査結果

牛と体外皮拭き取り検体の生菌数 ( $\log \text{cfu/cm}^2$ ) 及び腸内細菌科菌群数 ( $\log \text{cfu/cm}^2$ ) を表 1 に示す。生菌数については、全検体の平均値は  $6.78 \log \text{cfu/cm}^2$  であり、最小値は農場 SU から搬入された検体 1 の  $5.43 \log \text{cfu/cm}^2$ 、最大値は農場 KA から搬入された検体 11 の  $7.77 \log \text{cfu/cm}^2$  であった。農場毎に比較すると、農場 SU、HI 及び T0 で飼育されていた検体では、全体の平均値と同等かそれ以下の値を示したのに対し、農場 HE 及び KE では全体の平均よりも高い数値を示した。腸内細菌科菌群数については、全検体の平均は  $4.42 \log \text{cfu/cm}^2$  であり、最小値は農場 SU から搬入された検体 1 の  $3.32 \log \text{cfu/cm}^2$ 、最大値は農場 KA から搬入された検体 12 の  $5.50 \log \text{cfu/cm}^2$  であった。生菌数が最大値を示した検体 11 の腸内細菌科菌群数は  $4.87 \log$

$\text{cfu/cm}^2$  であり、最大値を示した検体 12 に次ぐ高値であった。各検体の数値は、生菌数と同様の傾向を示した。

### (2) 牛と体外皮拭き取り検体における病原細菌検査結果

牛と体外皮拭き取り検体におけるサルモネラ属菌及び STEC 検査結果を表 2 に示す。

#### 1) サルモネラ属菌の検査結果

サルモネラ属菌は、いずれの検体からも分離されなかった。

#### 2) STEC の検査結果

各検体の増菌培養液から抽出した DNA を用いた *stx* 及び *eae* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR の結果、農場 HI、HE 及び KA から搬入された 5 検体が *stx* 及び *eae* 陽性であった。これら 5 検体について、主要 7 血清群の O 抗原遺伝子を標的としたリアルタイム PCR を実施したところ、検体 4、9 及び 12 が O45 陽性、検体 12 が O121 陽性、検体 4、7、8、9 及び 12 が O157 陽性であった。農場 HI 及び KA から搬入された 4 検体は、複数の O 抗原遺伝子が陽性であった。増菌培養液から、陽性となった O 抗原の免疫磁気ビーズを用いて STEC の分離培養を試みたところ、O157 免疫磁気ビーズを用いた検体 7、

8、9 及び 12 から STEC が疑われるコロニーを得た。得られたコロニーの生化学性状試験、抗 0157 血清を用いた凝集試験、*stx* 及び 0157 抗原遺伝子を標的としたリアルタイム PCR により、分離された菌株はいずれも STEC 0157 であることが確認された。

(表 3-4)。

### 3) 分離された 0157 菌株の詳細解析

H 型別試験の結果、分離された菌株はいずれも 0157:H7 であった。*stx* 遺伝子型は、検体 7、8 及び 9 から分離された菌株では *stx1&stx2* であり、検体 12 から分離された菌株では *stx2* であった(表 4)。MLVA 法による解析では、農場 KA から搬入された検体 8 及び 9 から分離された菌株において、全 17 遺伝子座のリポート数が一致した(表 5)。検体 8 及び 9 から分離された菌株と同様に KA 農場から搬入された検体 12 から分離された菌株は、他の 2 菌株と 12 遺伝子座のリポート数が異なっていた(表 5)。検体 12 から分離された菌株は、生化学性状、*stx* 遺伝子型も他の菌株と異なっていた(表 3-4)。

(3) 牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と STEC 分離

### 状況の関連性の検討

検体を STEC 分離陽性及び分離陰性に区分し、衛生指標菌数との関連を検討した(図 4 及び表 6)。STEC 陰性検体における生菌数の平均値は  $6.53 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$  であり、STEC 陽性検体では  $7.28 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$  であった。2 群間の差を Welch 法で検定したところ、*p* 値は 0.062 であり、有意な差は認められなかったが、STEC 分離陽性検体では分離陰性検体と比較して生菌数が多い傾向が認められた。同様に腸内細菌科菌群数を比較したところ、STEC 分離陰性検体の平均値は  $4.26 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$  であり、STEC 分離陽性検体の平均値は  $4.73 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$  であった。2 群間の差を Welch 法で検定したところ、*p* 値は 0.216 であった。

次に、STEC が分離された検体が飼育されていた農場と STEC が分離された検体が飼育されていなかった農場の間で、衛生指標菌数との関連を検討した(図 5 及び表 7)。STEC 分離陰性の農場で飼育されていた検体における生菌数の平均値は  $6.29 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$ 、STEC 分離陽性の農場で飼育されていた検体では  $7.27 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$  であった。2 群間の差を Welch 法で検定したところ、*p* 値は 0.015 であり、有

意な差が認められた。同様に腸内細菌科菌群数を比較したところ、STEC 分離陰性の農場で飼育されていた検体の平均値は  $4.19 \log \text{cfu/cm}^2$  であり、STEC 分離陽性農場で飼育されていた検体の平均値は  $4.65 \log \text{cfu/cm}^2$  であった。2 群間の差を Welch 法で検定したところ、 $p$  値は 0.187 であった。

#### D. 考察

(1) 牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌検査結果

各検体及び飼育されていた農場毎の衛生指標菌数は、生菌数及び腸内細菌科菌群数で同様の傾向を示した。農場 HE 及び KA で飼育されていた検体では、他の 3 農場で飼育されていた検体に比べて生菌数、腸内細菌科菌群数ともに高値を示した(表 1)。

(2) 牛と体外皮拭き取り検体における病原細菌検査結果

今回の調査結果では、サルモネラ属菌は全ての検体で陰性だったものの、STEC 0157 が農場 HE 及び KA で飼育されていた検体から分離された(表 2)。特に農場 KA で飼育されていた検体からは、5 検体中 3 検体から STEC 0157 が分離された。分離された STEC 0157 菌株を MLVA 法で解析すると、農場 KA で飼育され

ていた検体 8 及び 9 から分離された菌株の 17 遺伝子座のリポート数が完全に一致し 2 菌株は由来を共通とすることが強く示唆された(表 5)。しかし、同じ KA 農場で飼育されていた検体 12 から分離された菌株とは、MLVA 法による解析結果は大きく異なり、生化学性状及び *stx* 遺伝子型いずれも上記 2 菌株と異なっていた(表 3-5)。以上により、STEC 汚染の進んだ農場は、由来の異なる複数の菌株に汚染されていることが示された。

(3) 牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と STEC 分離状況の関連性の検討

STEC が分離された検体では、STEC 陰性の検体と比較して、衛生指標菌数が多い傾向が認められた(図 4-5 及び表 6-7)。特に検体を STEC 分離陽性農場と分離陰性農場にわけて比較した場合、2 群間の生菌数は、統計学的に有意な差となり、衛生指標菌数は、STEC を始めとする病原微生物汚染と高い関連性があることが示された(図 5 及び表 7)。今回の検討では、検体間のばらつきが大きく、特に腸内細菌科菌群数ではばらつきが顕著であり、病原微生物汚染の指標としては生菌数の方がすぐれていることを示唆する結果となった。このばらつきの原

因として、外皮拭き取り検体では、と体の洗浄度に差が生じる可能性が高いことも考えられる。今年度は、検体採取が一度しか行えなかったが、経時的に複数回検体採取を行い、と畜場毎の傾向を分析することが必要であると考えられた。外皮拭き取り検体と枝肉の比較も有用であると考えられる。以上の点を踏まえて次年度は、より実効性の高い外部検証法を提示するための検討を行う予定である。

(誌上発表)

なし

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

#### E. 結論

今年度は、特定のと畜場に搬入される牛と体外皮拭き取り検体の衛生指標菌数、病原細菌検出状況を調査した。特定の農場から搬入される検体が STEC に高度に汚染されている状況が明らかとなった。衛生指標菌数と STEC 検出状況に関連性のあることが示された一方、検体間のばらつきが大きく、実効性の高い外部検証法を設定するためには、経時的な検体採取を行い、と畜場毎の傾向を分析すること等が重要であることが考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について  
(生食発0528第1号)  
別添3 外部検証のための微生物試験検体採取手順等  
に従い実施。

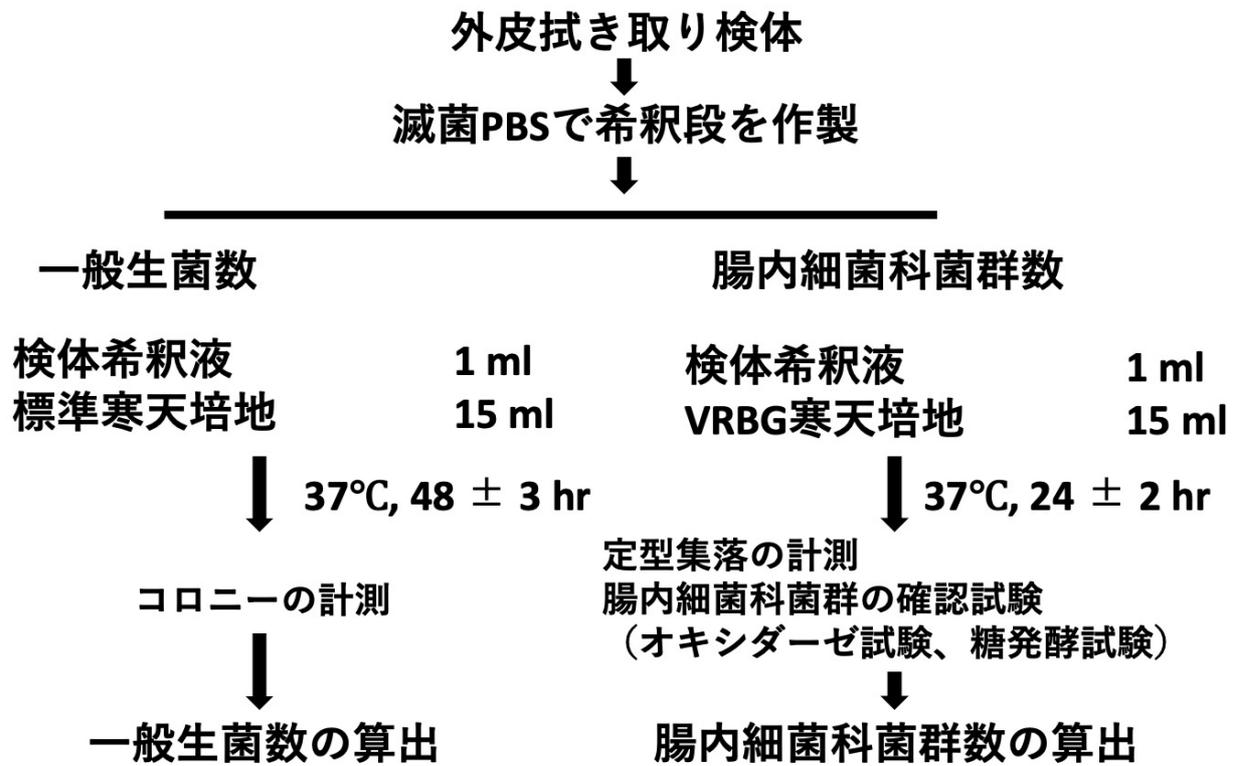


図1 一般生菌数および腸内細菌科菌群数の測定フロー

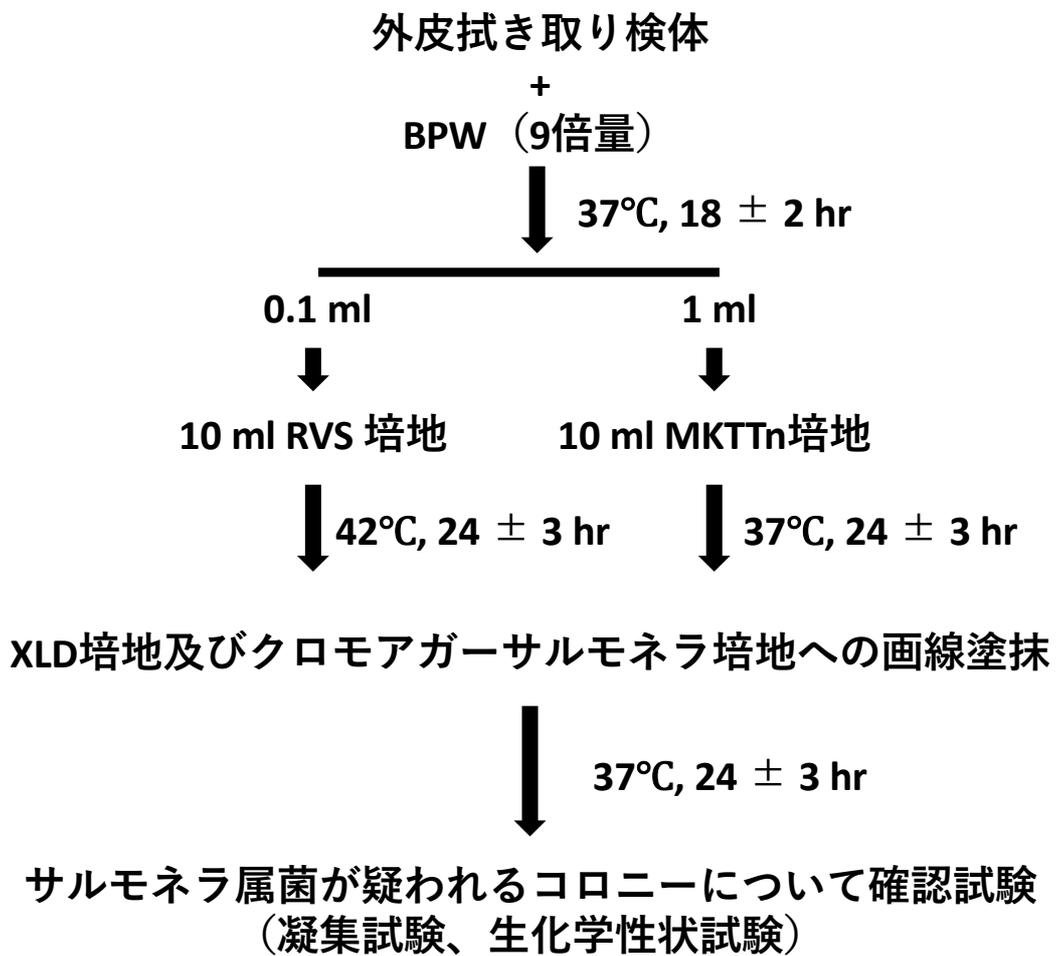


図2 サルモネラ属菌の検査フロー

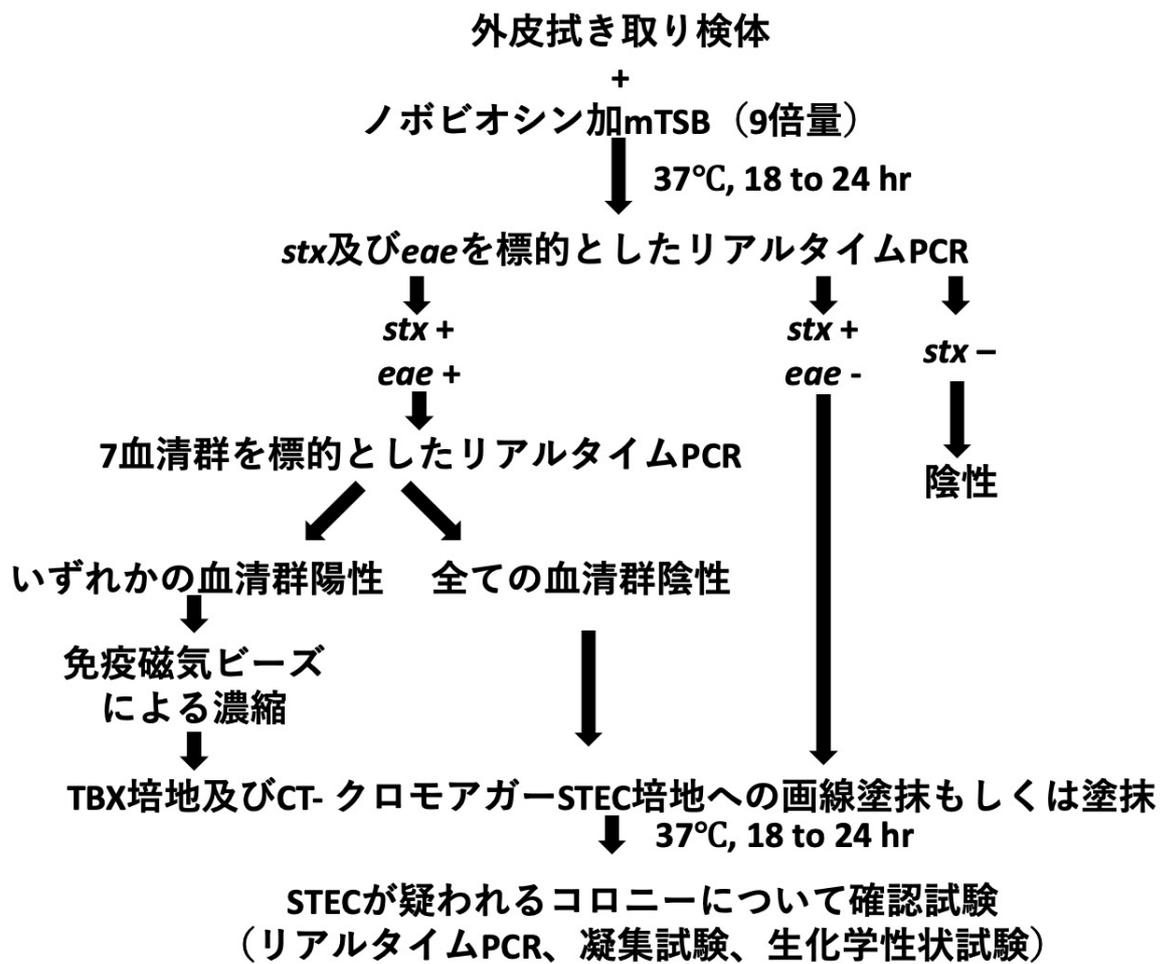


図3 腸管出血性大腸菌の検査フロー

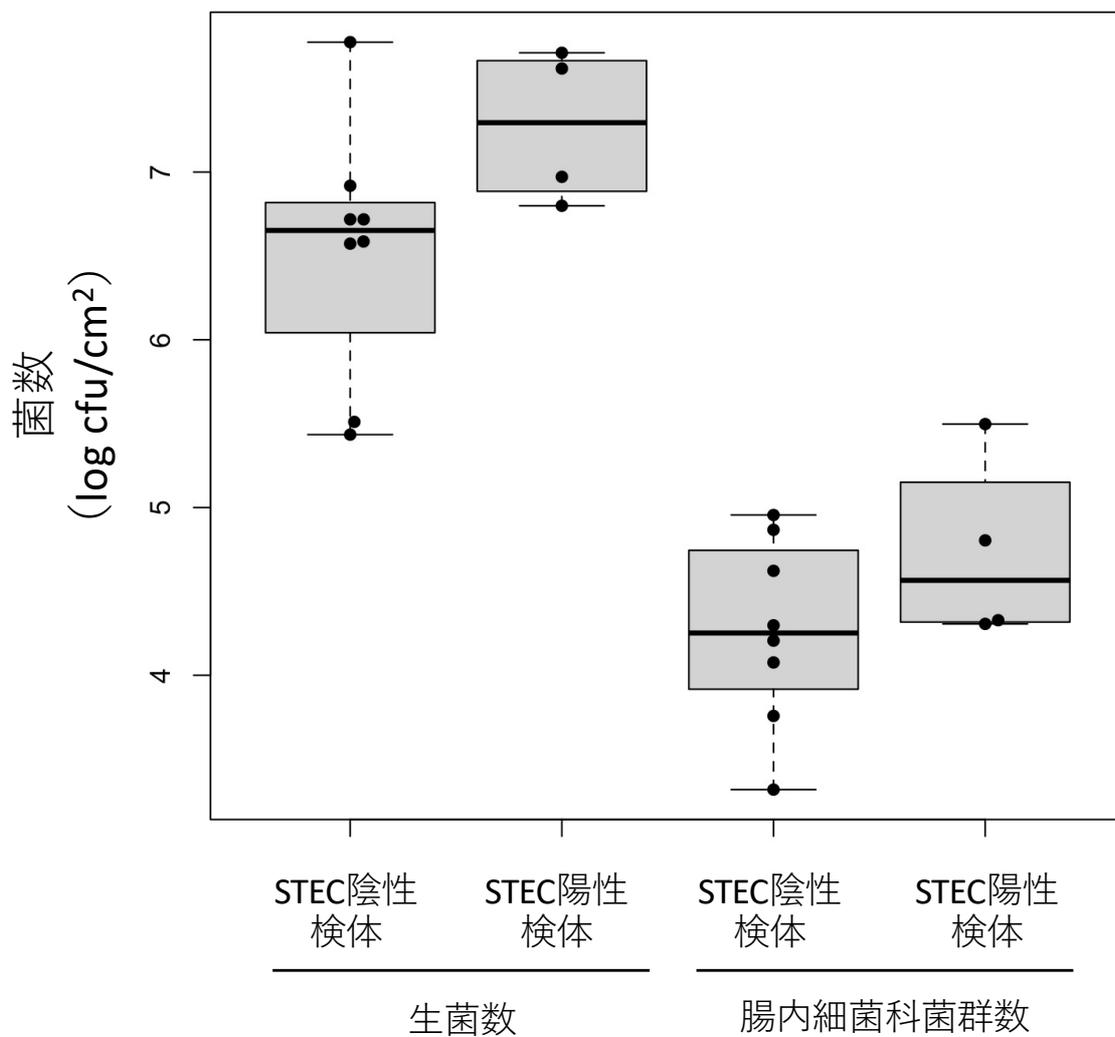


図4 STEC陽性検体と陰性検体における衛生指標菌数

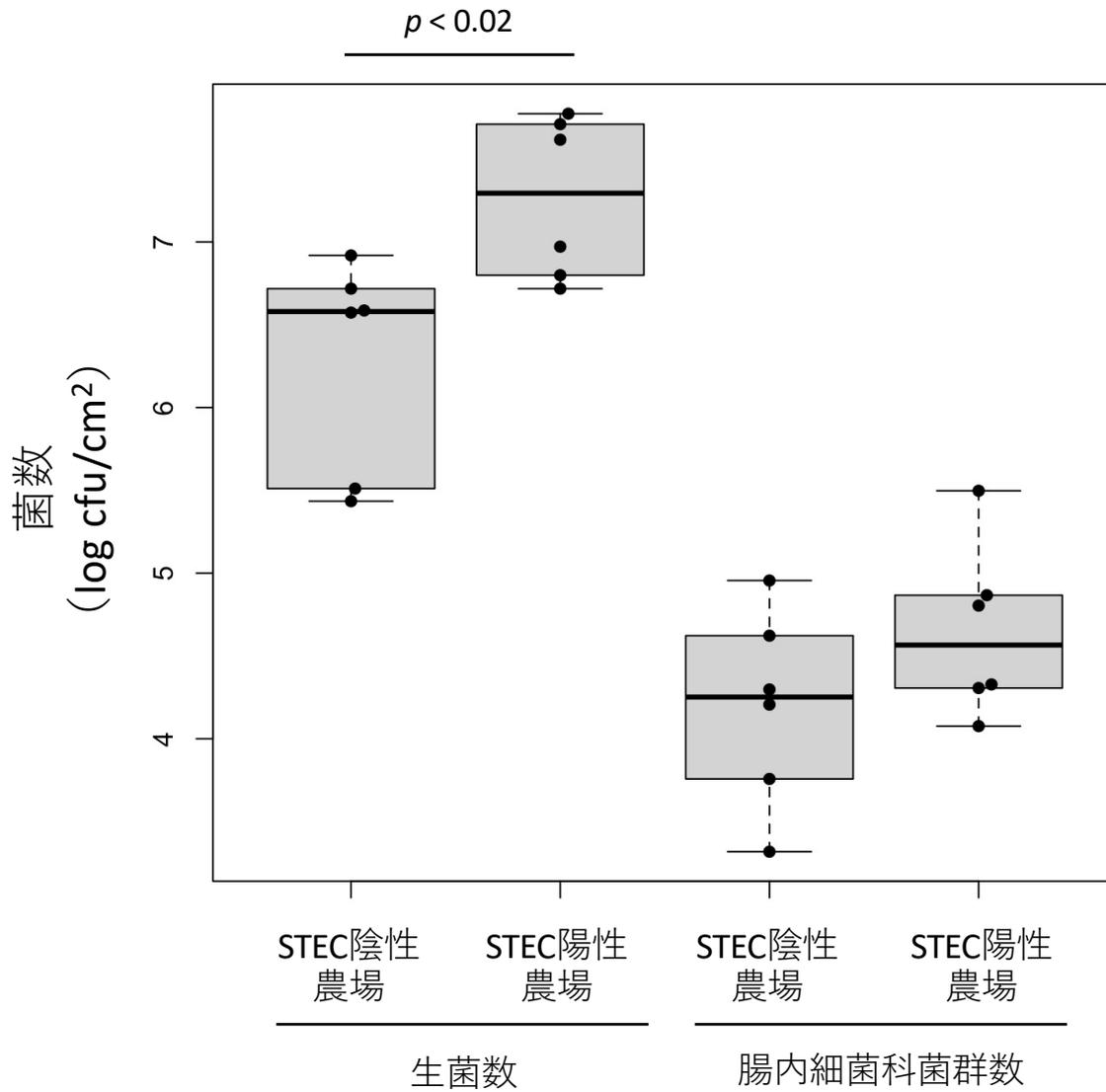


図5 STEC陽性農場と陰性農場の検体における衛生指標菌数

表1 牛と体外皮拭き取り検体の衛生指標菌検査

農場	検体 番号	生菌数 (log cfu/cm <sup>2</sup> )	腸内細菌科菌群数 (log cfu/cm <sup>2</sup> )
SU	1	5.43	3.32
	2	5.51	3.76
	平均	5.47	3.54
HI	3	6.72	4.96
	4	6.57	4.30
	平均	6.65	4.63
TO	5	6.59	4.21
	6	6.92	4.62
	平均	6.75	4.41
HE	7	7.71	4.80
KA	8	6.80	4.31
	9	6.97	4.33
	10	6.72	4.08
	11	7.77	4.87
	12	7.62	5.50
	平均	7.18	4.61
	標準偏差	0.49	0.57
全検体	平均	6.78	4.42
	標準偏差	0.75	0.58

表2 牛と体外部拭き取り検体の病原細菌検査結果

農場	検体番号	サルモネラ属菌の 分離	STEC関連遺伝子のスクリーニング									STECの分離	
			<i>stx</i>	<i>eae</i>	O26	O45	O103	O111	O121	O145	O157		
SU	1	陰性	-	-	*NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	陰性	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
HI	3	陰性	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	4	陰性	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	陰性
TO	5	陰性	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	6	陰性	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
HE	7	陰性	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	O157を分離
	8	陰性	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	O157を分離
	9	陰性	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	O157を分離
KA	10	陰性	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	11	陰性	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	12	陰性	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	O157を分離

\*NA: Not applicable

表3 O157が疑われた菌株の生化学性状

菌株の由来		TSI培地			LIM培地		
農場	検体番号	斜面/高層	ガス	H <sub>2</sub> S	リジン	インドール	運動性
HE	7	黄/黄	+	-	+	+	-
	8	黄/黄	+	-	+	+	-
KA	9	黄/黄	+	-	+	+	-
	12	薄い赤/黄	+	-	-	+	-

表4 分離されたO157菌株の型別

菌株の由来		リアルタイムPCR			血清型
農場	検体番号	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	O157	
HE	7	+	+	+	O157:H7
	8	+	+	+	O157:H7
KA	9	+	+	+	O157:H7
	12	-	+	+	O157:H7

表5 分離されたO157菌株のMLVA法による解析結果\*

由来農場	検体番号	遺伝子座																
		EH111-11	EH111-14	EH26-7	EHC-6	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	EH111-8	EH157-12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157-25	O157-3	O157-34	O157-9
HE	7	-2	-2	-2	-2	8	-2	3	6	-2	-2	5	-2	-2	7	8	-2	-2
	8	2	-2	-2	-2	8	6	3	6	-2	4	5	4	11	7	8	12	13
KA	9	2	-2	-2	-2	8	6	3	6	-2	4	5	4	11	7	8	12	13
	12	-2	-2	-2	-2	2	5	9	7	-2	1	7	6	-2	4	9	9	14

\*各遺伝子座でリピート数の一致する検体は同じ色で示す。

表6 STEC分離陽性検体と分離陰性検体における衛生指標菌数の比較

検体区分	検体数	生菌数 (log cfu/cm <sup>2</sup> )			腸内細菌科菌群数 (log cfu/cm <sup>2</sup> )		
		平均値	標準偏差	中央値	平均値	標準偏差	中央値
STEC分離陰性検体	8	6.53	0.76	6.65	4.26	0.56	4.25
STEC分離陽性検体	4	7.28	0.46	7.30	4.73	0.56	4.57

表7 STEC分離陽性農場の検体と分離陰性農場の検体における衛生指標菌数の比較

農場区分	検体数	生菌数 (log cfu/cm <sup>2</sup> )			腸内細菌科菌群数 (log cfu/cm <sup>2</sup> )		
		平均値	標準偏差	中央値	平均値	標準偏差	中央値
STEC分離陰性農場	6	6.29	0.65	6.58	4.19	0.59	4.25
STEC分離陽性農場	6	7.27	0.49	7.29	4.65	0.52	4.57